



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

Trabajo de Fin de Grado
Grado en Farmacia

**“DISEÑO RACIONAL Y SÍNTESIS DE NUEVOS NANOSISTEMAS PARA LA
DETECCIÓN Y EL TRATAMIENTO SELECTIVO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA”**

Presentado por: María Morillo-Velarde Santos

Sevilla, 20 de Septiembre de 2016

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Área de Química Orgánica

Tutora: Prof. Victoria Valdivia Giménez

Trabajo experimental



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia

**“DISEÑO RACIONAL Y SÍNTESIS DE NUEVOS NANOSISTEMAS PARA LA
DETECCIÓN Y EL TRATAMIENTO SELECTIVO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA”**

Presentado por: María Morillo-Velarde Santos

Sevilla, 20 de Septiembre de 2016

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Área de Química Orgánica

Tutora: Prof. Victoria Valdivia Giménez

Trabajo experimental

Resumen

El cáncer de próstata es el segundo cáncer más diagnosticado en hombres y a nivel mundial la quinta causa de muerte por cáncer más común en estos. Este dato muestra la necesidad de nuevas terapias para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de próstata. El Trabajo de Fin de Grado que se presenta en esta memoria, se basa en el diseño de un sistema de transporte activo, mediante el uso de nanopartículas magnéticas recubiertas con el dipéptido urea Asp-CO-Glu **1**, que interacciona de forma selectiva con el Antígeno de Membrana Específico de Próstata (PSMA), para dirigir selectivamente la nanopartícula a las células cancerosas, con la finalidad de aumentar la eficacia de las técnicas de diagnóstico y tratamiento que actualmente se aplican al cáncer de próstata. Tras la síntesis de las nanopartículas funcionalizadas siguiendo una metodología adecuada, ha sido fundamental la caracterización exhaustiva de las mismas, con todas las técnicas que están a nuestro alcance, tales como dispersión de luz dinámica (DLS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectrofotometría Infrarroja (IR) y otras técnicas que evidencian la correcta funcionalización de las nanopartículas. En el futuro, resulta de gran interés la realización de ensayos biológicos con las nanopartículas funcionalizadas que confirmen su utilidad en el diagnóstico y tratamiento selectivo del cáncer de próstata, tales como su capacidad de generar calor para inducir la muerte de células cancerosas sólo en el área específica, con un daño mínimo al tejido normal o su capacidad de ser guiadas por fuerza magnética, para la administración de fármacos con el aumento consiguiente de la de eficacia de estos.

PALABRAS CLAVE: cáncer de próstata, nanomedicina, PSMA, nanopartículas magnéticas.

Índice

1. Introducción	9
2. Objetivos	19
3. Metodología	21
3.1. Formación del dipéptido tri- <i>tert</i> -butil (9 <i>S</i> ,13 <i>S</i>)-3,11-dioxo-1-fenil-2-oxa-4,10,12-triazapentadecano-9,13,15-tricarboxilato (5)	21
3.2. Desprotección de la amina del dipéptido: Formación del di- <i>tert</i> -butil (5)-6-amino-1-(<i>tert</i> -butoxi)-1-oxohexan-2-il)carbamil)-L-glutamato (6)	22
3.3. Formación del L-glutamato de di- <i>tert</i> -butil (((5)-1-(<i>tert</i> -butoxi)-6-isotiocianato-1-oxohexan-2-il)carbamoilo) (7)	22
3.4. Funcionalización de nanopartículas de Fe ₂ MnO ₄ con el isotiocianato 7	23
3.5. Obtención de las nanopartículas desprotegidas finales 9	24
4. Resultados y discusión	25
4.1. Resultados obtenidos en el proceso de funcionalización de las nanopartículas magnéticas mediante formación de un enlace tiourea entre el isotiocianato 7 y la nanopartícula	25
4.2. Resultados obtenidos en el proceso de desprotección de las nanopartículas magnéticas 8 para obtener las nanopartículas finales 9	30
5. Conclusiones	32
6. Bibliografía	33

1. Introducción

A nivel mundial, el cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más prevalente y la quinta causa más común de muerte por cáncer en hombres¹ (Faraji y Wipf, 2009), con 1,1 millones de nuevos casos (15% de todos los cánceres en hombres) y 300.000 muertes (7% de todas las muertes por cáncer en hombres) sólo en el año 2012.²

Se trata del segundo cáncer más diagnosticado en hombres. Sin embargo, en Europa y España es, desde hace unos años, el primero en número de diagnósticos (436.500 en Europa en 2012 y 32.641 en España en 2014). Se estima que en este año se producirán 26.120 muertes a causa de esta enfermedad. Por razones desconocidas, el riesgo de cáncer de próstata es un 70 % mayor en hombres de origen africano aunque también destaca en poblaciones nórdicas. La mayoría de los casos de cáncer de próstata (92 %) se detectan cuando la enfermedad está limitada a la próstata y a los órganos adyacentes.³

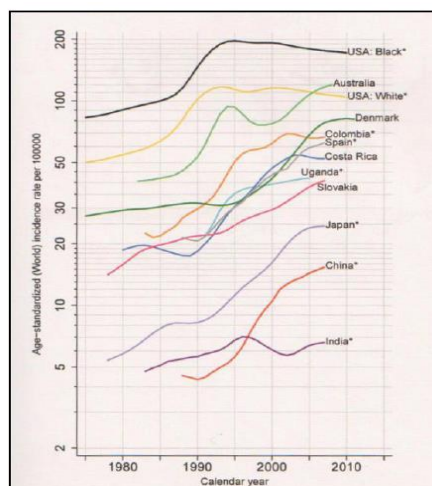


Figura 1: Tasas de incidencia del cáncer de próstata (CaP) estandarizadas por edad entre 1975 y 2012 (por cada 100.000 habitantes) en diferentes partes del mundo. Dichas tasas aumentaron drásticamente a finales de los años 80 en Norteamérica, debido a la introducción y uso masivo de la determinación del PSA en suero. Un patrón similar de crecimiento en las tasas de incidencia de CaP fue observado en otros países desarrollados durante los años 90, y actualmente también se está observando en países emergentes (WHO 2014) (www.who.int/es).

Desde los años 80 se ha producido un descenso paulatino de la mortalidad a causa de esta enfermedad, debido principalmente a la detección temprana y a la mejora del tratamiento, aunque sigue siendo una de las enfermedades que más muertes causa cada año en los países occidentales (Figura 1) (Foss y cols., 2014).

¹ www.aecc.es

² www.who.int/es

³ www.cancer.net

Las dos causas principales que contribuyen a esta elevada mortalidad son: 1) la incapacidad para discernir el grado de agresividad de la enfermedad del paciente, complicando la elección de la terapia apropiada; y, 2) la dificultad para extirpar la masa tumoral por completo, lo que podría acarrear posibles recaídas al no haber retirado el tumor en su totalidad.

Generalmente, la evolución de este tipo de cáncer es bastante lenta y sus síntomas suelen aparecer en edades avanzadas. Su tratamiento dependerá básicamente del estadio en el que se encuentre la enfermedad para tener una mayor eficacia (Figura 2) (Xiang y cols., 2013).

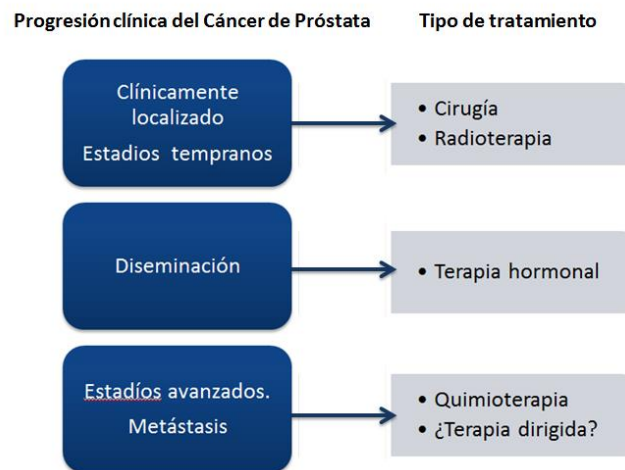


Figura 2: Tratamientos empleados en función del estadio del Cáncer de Próstata

Los cánceres de próstata en etapas tempranas son tratados de manera exitosa, normalmente, a través de terapias convencionales (cirugía y radioterapia). Actualmente, la cirugía (prostatectomía radical) es el tratamiento más usado para cánceres de próstata clínicamente localizados y proporciona una ventaja de supervivencia en comparación con una revisión médica regular. Mediante este tipo de tratamiento se extrae por completo la próstata y los tejidos circundantes (Hrkach y cols., 2012). Un problema acuciante de este tipo de tratamiento es la garantía de una resección completa del tumor, o sea, un margen quirúrgico negativo. En el caso de presentar un margen quirúrgico positivo, se requiere una radioterapia adyuvante (ocurre en más del 25% de los pacientes). La radioterapia se emplea principalmente para eliminar el tejido canceroso por completo, y además puede ser utilizada para preparar la zona antes de la intervención. Es muy habitual el uso de la radioterapia aun sin ser necesitada, ya que se carece de métodos para la visualización precisa de la masa tumoral al completo. Esto supone unos costes anuales bastante elevados (Chen y cols., 2012).

Sin embargo, si el cáncer se ha diseminado fuera de la glándula prostática, pueden ser necesarios otro tipo de tratamientos para destruir las células cancerosas diseminadas por el organismo. En este caso, se emplea con asiduidad la terapia hormonal. Este tipo de tratamiento no se puede administrar en la fase más temprana del cáncer de próstata debido a que actúa a

nivel sistémico. La evolución del cáncer de próstata está asociada a la acción de la testosterona, por lo que el objetivo es reducir los niveles de esta hormona o bloquear su acción con el fin de evitar el crecimiento del tumor, que se puede lograr al combinarse con otros tratamientos. En muchos casos la regresión del cáncer es transitoria, debido a que después de la terapia se producen metástasis y el cáncer se vuelve independiente de los andrógenos.

Los cánceres de próstata en etapas avanzadas y metastásicos tienen peor pronóstico de tratamiento, haciendo evidente la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que mejoren los resultados en este tipo de pacientes (Wang y cols., 2007) (Huang y cols., 2014). El tratamiento de estos cánceres más agresivos se basa en terapias no específicas como la quimioterapia, cuyo tratamiento estándar está constituido por docetaxel en combinación con prednisona. Los datos clínicos acumulados han mostrado que la quimioterapia puede alargar la vida de los pacientes con cáncer de próstata en estadios avanzados durante no más de 12-15 meses. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos convencionales exhiben toxicidad no sólo hacia las células cancerosas, sino también hacia una gran variedad de tejidos sanos (Fu y cols., 2012). Esto se debe al bajo Índice Terapéutico (IT) que presentan los fármacos antitumorales, incapaces de alcanzar concentraciones terapéuticas en el tejido diana, lo que conlleva que la dosis requerida para producir un efecto antitumoral sea tóxica para los tejidos normales (Sanna y Sechi, 2012).

Además, la aparición de resistencias a múltiples fármacos (MDR), representa en la actualidad aproximadamente un 90% de fallos en este tipo de terapia, lo que en combinación con una baja selectividad por el tejido tumoral, una inadecuada penetración en las células cancerosas y un rápido aclaramiento del torrente sanguíneo, desembocan en regímenes de tratamiento muy intensos y con devastadores efectos secundarios (Bhirde y cols., 2014).

Esta situación hace patente la urgente necesidad de desarrollar terapias alternativas que resuelvan esta problemática, y así idealmente, eviten la toxicidad sistémica. (Chen y cols., 2012) (Davis y cols., 2005).

En la actualidad, el concepto de la administración dirigida de fármacos y marcadores de diagnóstico mediante el uso de nanotransportadores está convirtiéndose en una realidad, llegando a ocupar un importante espacio en la industria farmacéutica. Los sistemas de liberación se pueden adaptar utilizando nanocarriers para la interacción con las células y tejidos diana, consiguiendo el control, y por tanto, los efectos terapéuticos deseados. En la búsqueda de nuevas técnicas de sistemas de liberación, muchos nanosistemas, como liposomas, nanocápsulas, dendrímeros, nanotubos de carbono y nanopartículas, no sólo han demostrado ser capaces de liberar los fármacos selectivamente al tejido diana, sino que también son capaces de disminuir la toxicidad y los efectos adversos asociados a su administración. (Sajid y cols. 2016).

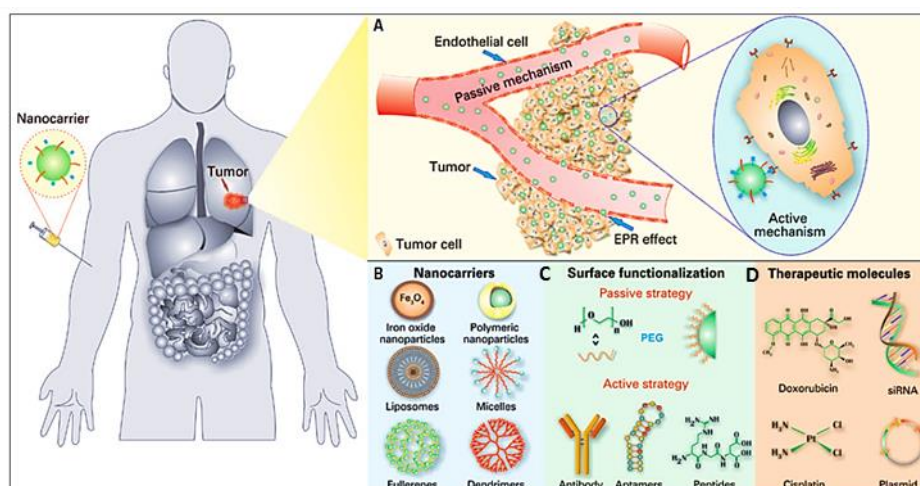


Figura 3: Nanotransportadores para el tratamiento del cáncer. (A) Los nanovectores se pueden acumular en el tumor, como efecto del mecanismo conocido como EPR (*enhanced permeability and retention*), debido al incremento de permeabilidad vascular en la región tumoral. Además, los mecanismos activos incrementan la entrada de nanovectores en las células cancerosas. Este mecanismo comprende las posibles moléculas que pueden localizarse en la superficie del nanovector para que sean reconocidas específicamente por los receptores localizados en la membrana celular. (B) Ejemplos de nanovectores. (C) Ejemplos de ligandos de superficie de nanovectores. (D) Ejemplos de ligandos terapéuticos usados para el tratamiento o el diagnóstico de cáncer (Vieira y Gamarra, 2016).

El marcador de superficie (antígeno o receptor) de la célula diana debe ser específico o estar sobreexpresado respecto a las células normales para aumentar la especificidad de la interacción. Por otra parte, la superficie de los nanotransportadores debe presentar múltiples copias del ligando (Figura 3C), de manera que se origine una interacción multivalente, aumentando así el número de interacciones ligando-receptor y, por tanto, la fortaleza y afinidad de las células con el nanotransportador. (Figura 3B).

Los ligandos utilizados en el transporte activo de agentes pueden ser macromoléculas tales como proteínas (principalmente anticuerpos y sus fragmentos), péptidos, ácidos nucleicos (aptámeros) o moléculas pequeñas tales como el ácido fólico o carbohidratos (Figura 3D) (Blau y Fleming, 2004).

Se ha visto que el uso de moléculas de bajo peso molecular como ligandos de direccionamiento, en lugar de anticuerpos, supondría una mejora significativa debido a sus grandes ventajas respecto a estos. Los ligandos pequeños son fáciles de preparar a gran escala, presentan propiedades farmacocinéticas favorables (mayor biodisponibilidad, vida media, penetración tumoral, etc.) y podrían penetrar la barrera hematoencefálica (Banerjee y cols., 2008) (Slovin, 2005) (Kasten y cols., 2013).

Además, se pueden sintetizar numerosos análogos modificados de manera sencilla, de modo que se podría llegar a conseguir una especificidad y afinidad potenciadas.

Teniendo presente el objetivo que perseguimos, la obtención de un dispositivo capaz de dirigirse a una diana específica, nos valdremos del antígeno de membrana específico de próstata, como herramienta.

El antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), es una glicoproteína integral transmembrana de tipo II, también conocida como glutamato carboxipeptidasa II (GCP II), que actualmente es considerada como una prometedor diana biológica específica para la liberación de fármacos y para el diagnóstico del cáncer de próstata (Machulkin y cols., 2016).

La sobreexpresión génica del PSMA predomina en las células de este tipo de cáncer y está relacionada directamente con progresión y agresividad del tumor, sobre todo en pacientes en estadios más avanzados y metastásicos (Haley y Frenkel, 2008). La expresión de PSMA va en aumento según el grado de agresividad del tumor (Nogueira y cols. 2009). El PSMA se sobreexpresa entre 100 y 1000 veces más en el cáncer de próstata que en los tejidos normales donde se expresa moderadamente, como en el intestino delgado, los riñones y el sistema nervioso de la glía. Además, el PSMA también se expresa en el endotelio de la gran mayoría de tumores sólidos (aparte del de próstata), lo que lo convierte en una diana aún más interesante ya que podría ser diana de fármacos específicos anti-angiogénicos (Kroon y cols., 2014).

Respecto a su estructura, el PSMA tiene una cola citoplasmática N-terminal (18 aminoácidos), que contiene un motivo de internalización MXXXL que provoca la internalización de PSMA y su reciclaje endosomal tras la unión de su sustrato. (Rajasekaran y cols., 2005) (Tykvart y cols., 2014). Se cree que la internalización se da por interacción del N-terminal con la calveolina-1, formándose invaginaciones membranales recubiertas de clatrina. Además, presenta una estructura transmembranal helicoidal (24 aminoácidos) y un dominio C-terminal extracelular grande (706 aminoácidos). El dominio extracelular está altamente glicosilado. Los oligosacáridos unidos a este dominio constituyen más del 25% del peso molecular de la proteína. Esta glicosidación es necesaria tanto para su actividad enzimática como para el plegamiento y direccionamiento a la membrana (Felgueiras y cols., 2014). La porción extracelular, que existe como un dímero en condiciones fisiológicas, incluye el sitio activo del receptor. Su sitio activo contiene dos bolsillos de unión a sustrato, el bolsillo S1 (no farmacóforo) y el bolsillo S1' (farmacóforo). El S1' (Figura 44B) se genera por aminoácidos anfipáticos muy sensibles a modificación estructural por unión del ligando, demostrando una fuerte preferencia por los residuos de glutamato u otros de estructura similar (Malam y cols., 2009) (Osborne y cols., 2014) (Singh y Lillard, 2009). En las proximidades del bolsillo S1 se encuentra un túnel en forma de embudo que se proyecta hacia la superficie de la enzima, con una profundidad de unos 20 Å y una anchura de unos 8-9 Å. De manera similar, se ha encontrado una estructura semejante cerca del bolsillo S1'. Además, se ha determinado que el glutamato de los sustratos del PSMA tiene una predisposición para ubicarse en la cavidad

estrecha del bolsillo S1', mientras que el resto del sustrato residiría en el gran bolsillo S1 (Figura 4B).

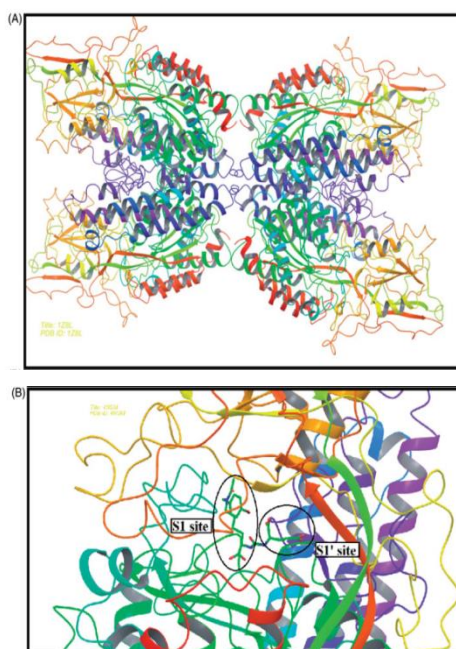


Figura 4: (A) Estructura de PSMA. (B) Sitios de union S1 y S1' indicados por los círculos negros.

El PSMA posee dos actividades enzimáticas. En el cerebro se encarga de la degradación del péptido neurotransmisor N-acetil-L-aspartil-L-glutamato (NAAG; actividad NAALADasa), dando lugar a N-acetilaspartato y glutamato. El NAAG es el péptido neurotransmisor más abundante en el Sistema Nervioso de mamíferos. Se libera de las vesículas presinápticas mediante un mecanismo dependiente de calcio y se une como antagonista al receptor metabotrópico de glutamato 3 (mGluR3) en las neuronas presinápticas y astrocitos, lo que provoca la inhibición de la liberación de glutamato e induce la secreción del factor de crecimiento transformante β , respectivamente. Ambos procesos son neuroprotectores. En el intestino delgado escinde los glutamatos terminales de folatos poliglutamados (actividad folato hidrolasa). Aquí, es responsable de ayudar a la absorción del folato para el transporte de éste al resto del cuerpo. Los folatos de la dieta existen en forma de folatos poliglutamados, pero sólo los folatos monoglutamados pueden ser absorbidos por los enterocitos yeyunales. En la próstata no se conoce, a día de hoy, cuál es su función concreta.

El PSMA es una diana prometedora para el diagnóstico y la terapia del cáncer de próstata debido a que se expresa de manera abundante en el cáncer de próstata, y en otros tejidos tumorales; está presente en la superficie celular pero no se libera a la circulación, posee un gran dominio extracelular y tiene proclividad para internalizarse tras la unión con sus ligandos.

Los análogos del dipéptido N-acetil-L-aspartil-L-glutamato han mostrado una excelente actividad inhibidora del PSMA y constituyen excelentes ligandos para el transporte activo y dirigido hacia el cáncer de próstata. En este sentido, el dipéptido urea Asp-CO-Glu **1**, figura 5,

es un excelente inhibidor del PSMA con un IC_{50} de 45nM, y ha sido escogido como ligando para este estudio.

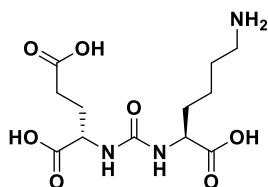


Figura 5: Estructura del dipéptido urea Asp-CO-Glu 1

Por otro lado, los **nanomateriales** proporcionan una innovadora y prometedora alternativa a las formulaciones convencionales para el tratamiento del cáncer, permitiendo una eficiente encapsulación y unión del fármaco antitumoral. Además se espera que las nanoformulaciones, que presentan nuevas propiedades, estructuras y dispositivos, mejoren la liberación y la estabilidad *in vivo* del fármaco, lo que puede evitar muchos de los problemas de los enfoques terapéuticos convencionales y dar un salto cualitativo en el progreso de los sistemas diagnóstico del cáncer.

En este sentido, las nanopartículas magnéticas (Lee y cols., 2015) han recibido una enorme atención en diversos campos debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas a nanoescala y su enorme potencial para una amplia gama de aplicaciones (Laurent y cols., 2008) (Hao y cols., 2010) (Tartaj y cols., 2011). En particular, en la última década, la síntesis y aplicaciones de nanopartículas magnéticas de alta calidad ha sido uno de los puntos de investigación más activos en química, ingeniería química y ciencia de los materiales (Kainz y Reiser, 2014). De modo que actualmente se pueden sintetizar nanopartículas magnéticas de tamaño uniforme útiles en diversas aplicaciones (Kim y cols., 2011), tales como de almacenamiento de datos (Moser y cols., 2002), catálisis (Shokouhimehr y cols., 2007), bioseparación (Lee y cols., 2006) y biosensores (Kaittanis y cols., 2011) (Gaster y cols 2011).

Las nanopartículas magnéticas típicas que se obtienen mediante la técnica de síntesis conocida como “bottom-up” consisten en un núcleo magnético (por ejemplo, de Fe_3O_4 , Fe, Co (Peng y cols., 2006) Ni, (Park y cols., 2005) FePt, (Sun y cols., 2000) etc) y una superficie orgánica (por ejemplo: polisacáridos, polímeros (Lattuada y Hatton, 2007), y moléculas pequeñas (Song y cols., 2005)) o inorgánica (por ejemplo: sílica (Guerrero-Martínez y cols., 20010) y otras nanopartículas (Gao y cols., 2007)). Aunque las propiedades físicas de las nanopartículas están determinadas por su núcleo inorgánico, sus propiedades de la superficie también juegan un papel importante, especialmente en la interconexión eficaz con los sistemas biológicos (por ejemplo, asegurando la biocompatibilidad y la localización específica), tales como proteínas, células y tejidos (Berry y cols., 2004). Por ejemplo, las propiedades magnéticas, incluyendo magnetización saturada (Ms) y constante anisotrópica magnética (K) del núcleo, tienen un papel

importante en la relajación de los protones del agua, la cantidad de fuerza de atracción generada, y el grado de modificación de calor de superficie producido (Yun y cols., 2008). La modificación de la superficie del núcleo magnético con materiales hidrófilos, tales como dextrano y polietilenglicol (PEG), hace que las nanopartículas puedan ser útiles para los sistemas biológicos con alta estabilidad coloidal (Walkey y cols 2012). Por otra parte, la funcionalización de la superficie con anticuerpos, aptámeros (von Maltzahn y cols., 2011) y péptidos pequeños puede inducir funciones diferentes en las nanopartículas relacionadas con la formación de imágenes y terapia multimodal con especificidad de diana.

Entre los muchos tipos de nanopartículas magnéticas, las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIOs), han sido ampliamente investigadas por sus aplicaciones biomédicas (Ling y Hyeon, 2012) concretamente, han sido intensamente investigadas como agentes de contraste de imágenes por resonancia magnética (MRI) (Lee y Hyeon. 2012); El desarrollo adicional de la síntesis y la química de nanopartículas bioortogonales ha ampliado sus aplicaciones en otras áreas terapéuticas (Mahmoudi y cols., 2011). Por ejemplo, las SPIOs se captan rápidamente por el sistema reticuloendotelial (RES), y se utilizan con éxito para detectar lesiones tumorales en el hígado (Reimer y Tombach., 1998).

Las aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de óxido de hierro han mostrado nuevas posibilidades para el tratamiento del cáncer (Figura 6). Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas generan calor eficientemente bajo aplicado de forma remota y a campos magnéticos alternos para inducir la muerte de células cancerosas de manera no invasiva sólo en el área específica con un daño mínimo al tejido normal (Fortin y cols., 2007). Este tipo de concepto terapéutico de la hipertermia ya ha sido aprobado en Europa (Thiesen y Jordan, 2008). Las nanopartículas magnéticas guiadas por fuerza magnética, también se pueden utilizar para la administración de fármacos con el aumento consiguiente de la eficacia de estos (Jain y cols., 2005).

Su uso como agentes de contraste de Resonancia Magnética de Imagen (MRI) es una de las principales áreas de aplicación de estas nanopartículas. Se basa en los mismos principios que la de resonancia magnética nuclear (NMR). En este caso, para obtener una señal de resonancia magnética, un paciente o muestra se coloca en un campo magnético fuerte (B_0). A continuación, los espines nucleares de hidrógeno se orientan ya sea en la misma dirección al campo magnético (estado de menor energía) o en oposición al campo magnético (estado de mayor energía). Cuando se irradia una radiofrecuencia de resonancia, el núcleo absorbe la energía con un incremento del estado de mayor energía. A continuación, los núcleos vuelven al estado de equilibrio, lo que se conoce como la relajación. Durante el proceso de relajación, los núcleos excitados emiten una radiofrecuencia débil que puede ser detectada. En términos de capacidad de relajación, muestran valores muy altos de R_2 / R_1 , postulándose como buenos agentes de contraste de tipo T2 para la formación de imágenes moleculares.

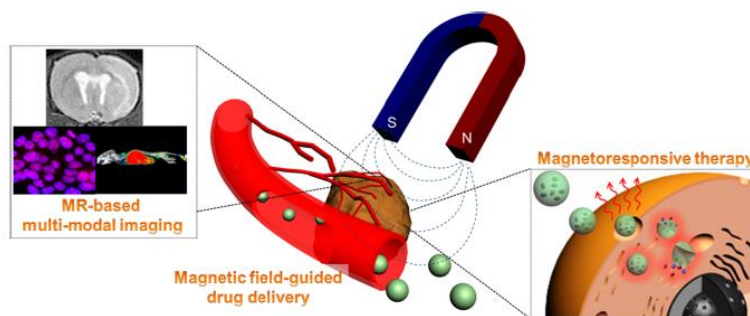


Figura 6: Diferentes usos terapéuticos de las nanopartículas de hierro.

En relación a sus usos, además de lo expuesto anteriormente, las SPIOs han sido aprobados por la FDA y se han aplicado con éxito en la práctica clínica como agentes de contraste del intestino (Lumiren® y Gastromark®) y también para el hígado y bazo (Endorem® y Feridex IV ®) (Pernia-Leal y cols., 2015).

Otra ventaja de las SPIOs es que pueden ser fácilmente sintetizadas con control de tamaño y producción de bajo coste a través de métodos de descomposición térmica (Gupta y Gupta, 2005).

La incorporación de un ion paramagnético en la estructura de ferrita induce un aumento de la magnetización del material que conduce a una mejora de sus propiedades magnéticas (Lee y cols., 2007) (Sahoo y cols., 2014). Pero el uso de manganeso para aplicación biomédica trae consigo otro inconveniente, la alta toxicidad de los iones Mn^{+2} (Crossgrove y Zheng, 2004), por lo que se convierte en crucial el desarrollo de estrategias de recubrimiento que protejan el núcleo inorgánico de las nanopartículas magnéticas para aumentar su estabilidad en entornos biológicos (Colombo y cols., 2012).

Las estrategias de recubrimiento se pueden clasificar en dos categorías: encapsulación micelar e intercambio de ligandos.

La encapsulación micelar es el método más universal y extendido, se basa en la adición de una segunda capa de un polímero anfífilo que interactúa de manera no covalente con la capa hidrófoba externa de la nanopartícula. Esta interacción no es suficientemente estable y es necesaria una funcionalización adicional para aumentar la estabilidad de la cubierta alrededor del núcleo inorgánico de la nanopartícula. La otra estrategia de recubrimiento, el intercambio de ligandos, requiere el uso de moléculas de ligando más reactivas que el tensioactivo unido a la nanopartícula durante la síntesis. Por lo tanto, una molécula de ligando estándar presentaría un grupo de anclaje en un lado, que se une a la superficie de las nanopartículas y un grupo reactivo en el otro lado. La estabilidad en medios acuosos de las nanopartículas magnéticas formadas por intercambio de ligandos, depende, de la interacción entre el grupo de anclaje del ligando y la

superficie de las nanopartículas magnéticas, y también del equilibrio hidrófilo de las nanopartículas funcionalizadas (Amstad y cols., 2009). El polietilenglicol (PEG) es un espaciador hidrófilo ideal para el intercambio de ligandos, ya que no sólo modula el equilibrio hidrófilo de las nanopartículas magnéticas, sino también es compatible con la resistencia a la adsorción de proteínas y ayuda a las nanopartículas a aumentar su tiempo de vida en la circulación y disminuir el aclaramiento reticuloendotelial (Tong y cols., 2010) (Karakoti y cols., 2011).

2. Objetivos

Con todo lo expuesto anteriormente, el Trabajo de Fin de Grado que se presenta en esta memoria, tiene como objetivo general el diseño de una vectorización activa, mediante el uso de nanopartículas magnéticas recubiertas con PEG a las que se le pretende unir a través del grupo reactivo del PEG mediante un enlace de tipo tiourea, el dipéptido urea Asp-CO-Glu **1** que interacciona de forma selectiva con el Antígeno de Membrana Específico de Próstata (PSMA), para, de esta forma, dirigir selectivamente la nanopartícula a las células cancerosas, con la finalidad de aumentar la eficacia de las técnicas de diagnóstico y tratamiento que actualmente se aplican al cáncer de próstata.

Para conseguir este objetivo general, nos hemos propuesto los siguientes objetivos parciales:

- En el marco de una colaboración con el Dr. Manuel Pernía Leal del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología de Málaga, hemos podido contar con nanopartículas magnéticas que presentan las características que se muestran a continuación y que están listas para su funcionalización con el ligando del PSMA. Se trata de nanopartículas magnéticas compuestas de Fe_2MnO_4 , con un tamaño del núcleo magnético (determinado por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de 6 nm y un tamaño hidrodinámico en agua de 20 nm con una cobertura de PEG de 3000 Da terminado en NH_2 (grupo reactivo), un número de grupos amino por partícula de aproximadamente 450 moléculas (aunque esto no quiere decir que todos estén disponibles) y en una disolución acuosa a concentración de 0.4 g/L de Fe/Mn, y de 3.5×10^{-5} M de nanopartículas. Por tanto, aprovechando la presencia de los grupo amino terminales de las nanopartículas, nos propusimos como primer objetivo, unirles a través de un enlace de tipo tiourea, el ligando dipéptido urea Asp-CO-Glu **1** del PSMA (Figura 7).

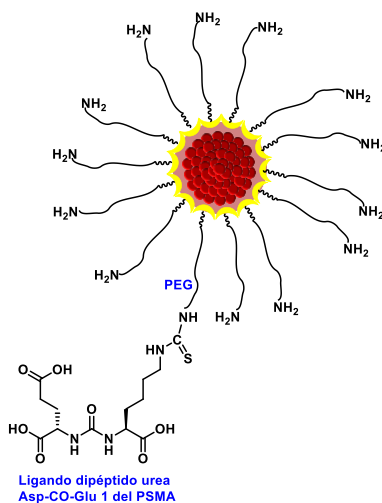


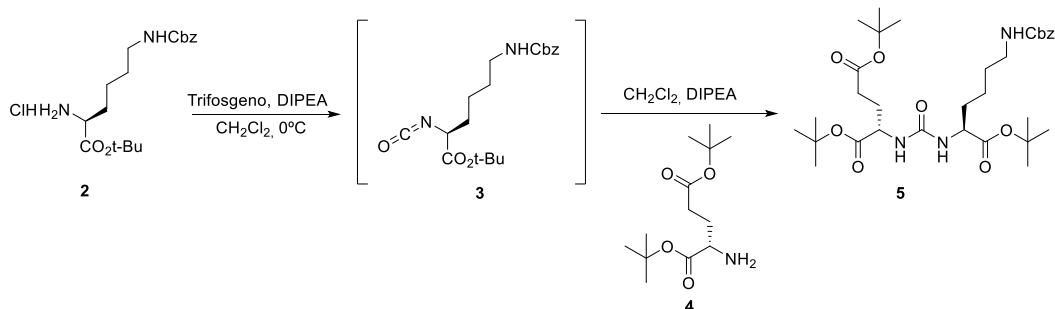
Figura 7: Esquema de una nanopartícula de Fe_2MnO_4 con PEG terminado en grupo amino funcionalizada con el dipéptido urea Asp-CO-Glu **1** inhibidor del PSMA.

- Tras la síntesis de las nanopartículas funcionalizadas, es indispensable llevar a cabo una caracterización exhaustiva de las mismas con todas las técnicas que están a nuestro alcance, tales como dispersión de luz dinámica (DLS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectrofotometría Infrarroja (IR) y otras técnicas que evidencien la correcta funcionalización de las nanopartículas.
- Realización de ensayos biológicos con las nanopartículas funcionalizadas que confirmen su utilidad en el diagnóstico y tratamiento selectivo del cáncer de próstata.

3. Metodología

Funcionalización de nanopartículas con el antígeno dipéptido urea Asp-CO-Glu 1 inhibidor del PSMA.

3. 1. Formación del dipéptido tri-*tert*-butil (9*S*,13*S*)-3,11-dioxo-1-fenil-2-oxa-4,10,12-triazapentadecano-9,13,15-tricarboxilato (5).



A una disolución de trifosgeno (64 mg, 0.22 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (1.1 ml), en agitación y a 0°C , se añadió una mezcla de un derivado protegido del aminoácido lisina **2** (200 mg, 0.54 mmol) en CH_2Cl_2 (1.1 ml) y diisopropil etil amina (a partir de ahora referido como DIPEA; 0.23 ml) gota a gota. Tras la adición se retiró el baño de hielo, teniendo lugar la reacción a temperatura ambiente. Se dejó en agitación durante 2 horas y media.

Transcurrida 1 hora y 45 minutos, se preparó en otro matraz una mezcla de un derivado protegido del aminoácido glutamato **4** (160 mg, 0.54 mmol) en CH_2Cl_2 (1.1 ml) y DIPEA (0.23 ml). Se dejó en agitación durante 45 minutos, tras los cuales se añadió al matraz de la reacción mediante una cánula. La reacción se dejó en agitación durante 24 horas.

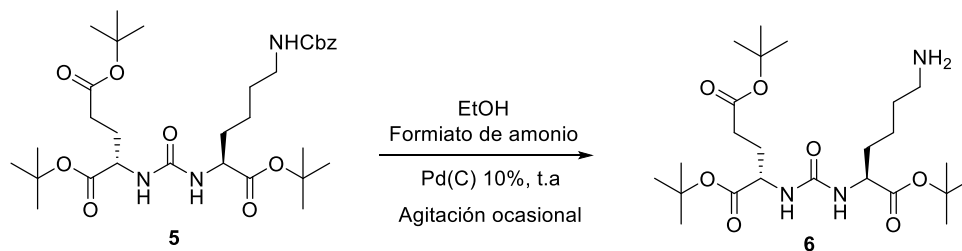
Se paró la mezcla y se evaporó el disolvente a vacío. La mezcla se lavó con CH_2Cl_2 (30 ml) y se separaron las fases utilizando KHSO_4 2M (2 x 15 ml) y una disolución saturada de NaCl (15 ml). Tras el secado de la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó el disolvente a presión reducida en el rotavapor, obteniéndose un crudo del cual se aisló el producto mediante columna cromatográfica usando como mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:2). Se obtuvo el dipéptido **3** con un rendimiento del 82 % (272 mg).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.35 (d, J = 4.4 Hz, 4H), 7.32-7.30 (m, 1H), 5.13-5.06 (m, 4H), 5.04-4.96 (m, 1H), 4.35-4.29 (m, 2H), 3.19-3.15 (m, 2H), 2.37-2.22 (m, 2H), 2.11-2.05 (m, 1H), 1.89-1.73 (m, 2H), 1.53-1.49 (m, 2H), 1.451 (s, 9H), 1.445 (s, 9H), 1.429 (s, 9H), 1.41-1.29 (m, 3H). 30

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 172.5, 172.4, 172.2, 156.8, 156.6, 136.7, 128.5, 128.1, 128.0, 82.1, 81.8, 80.6, 66.6, 53.3, 53.1, 40.6, 32.7, 31.6, 29.4, 28.4, 28.1, 28.03, 28.01, 22.2.

EMAR (EI): calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{O}_9\text{N}_3\text{Na}$ m/z 644.3518. Encontrado 644.3511.

3. 2. Desprotección de la amina del dipéptido: Formación del di-*tert*-butil ((*S*)-6-amino-1-(*tert*-butoxi)-1-oxohexan-2-il)carbamil)-*L*-glutamato (**6**).



A una disolución del dipéptido **5** formado en el paso anterior (197 mg, 0.32 mmol) en EtOH (5.3 ml), tras poner a vacío y con atmósfera de Argón, se añadieron formiato de amonio (200 mg, 3.2 mmol) y posteriormente Pd (C) 10% (34 mg, 0.032 mmol). La reacción se agitó ocasionalmente y a temperatura ambiente durante 48 horas.

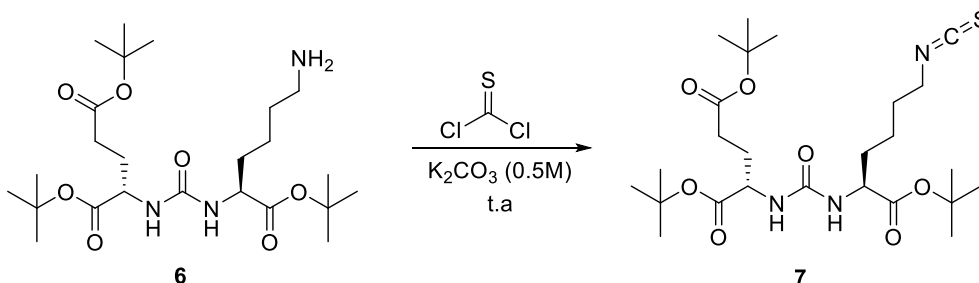
Una vez se comprobó que la reacción había terminado, se pasó la mezcla por una placa filtrante con Celita®545, añadiendo una gran cantidad de CH₂Cl₂ para que se filtrase el compuesto en su totalidad. Para comprobar que no quedaran rastros de producto de partida ni productos secundarios, se purificó el producto mediante una columna cromatográfica, utilizando como mezcla de eluyentes AcOEt:MeOH (9:1), obteniéndose el compuesto **6** con un rendimiento del 96% (184 mg).

1-H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.92-5.88 (m, 2H), 4.35-4.30 (m, 2H), 2.95-2.90 (m, 2H), 2.09-2.02 (m, 3H), 1.89-1.81 (m, 2H), 1.77-1.61 (m, 5H), 1.45 (s, 18H), 1.43 (s, 9H), 1.37-1.35 (m, 2H).

13-C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 173.19, 172.74, 157.48, 82.06, 81.56, 80.52, 53.43, 53.30, 52.90, 39.89, 31.73, 31.68, 29.70, 28.64, 28.26, 28.09, 28.04, 22.69, 21.97.

EMAR (EI): calculado para C₂₄H₄₆O₇N₃ *m/z* 488.3330. Encontrado 488.3328.

3. 3. Formación del L-glutamato de di-*tert*-butil (((*S*)-1-(*tert*-butoxi)-6-isotiocianato-1-oxohexan-2-il)carbamoilo) (**7**).



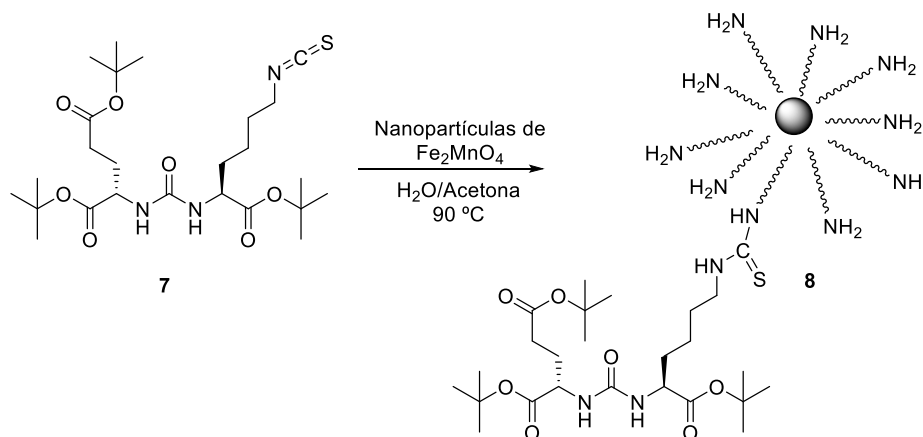
A una disolución de la amina **6** (184 mg, 0.38 mmol) en CH₂Cl₂ (6 ml), se añadió carbonato potásico (K₂CO₃) (6 ml) y transcurridos 15 minutos tiofosgeno (58 μl, 0.76 mmol).

Una vez pasadas 48 horas y viendo que la reacción había finalizado se filtró la mezcla con Celita®545 añadiendo cantidad abundante de CH₂Cl₂ para que se filtrase en su totalidad. Tras este paso, se realizó una columna de cromatografía para purificar el producto deseado y para ello se usó como mezcla de eluyentes AcOEt:MeOH (9:1). Se obtuvo de producto **7** con un rendimiento de 88.6 % (177 mg).

1-H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.179 (s, 1H), 4.382-4.317 (m, 3H), 3.555-3.522 (m, 2H), 2.366-2.294 (m, 3H), 2.098-2.059 (m, 2H), 1.891-1.641 (m, 10H), 1.495 (s, 9H), 1.484 (s, 9H), 1.455 (s, 9H).

13-C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 173.12, 171.53, 157.61, 132.14, 82.08, 59.21, 58.57, 53.69, 30.72, 30.02, 28.67, 26.06, 20.44.

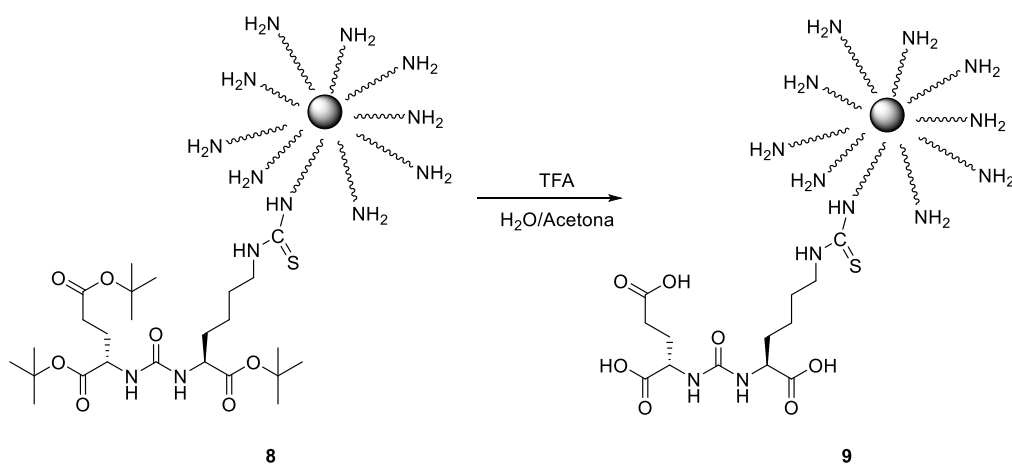
3. 4. Funcionalización de nanopartículas de Fe₂MnO₄ con el isotiocianato **7**.



Se tomaron 2 ml de una disolución formada por 1 mg del isotiocianato **7** en 10 ml de CH₂Cl₂. A ésta se le añadió 1 ml de las nanopartículas disueltas en H₂O y durante 48 horas se dejó calentando a 90°C.

Pasado este tiempo y tras evaporar el disolvente en el rotavapor, se procedió a la caracterización mediante diferentes técnicas como la prueba del llamado efecto Tyndall para confirmar la presencia de nanopartículas en disolución, espectrofotometría infrarroja (IR) para la detección de los grupos funcionales presentes en las nanopartículas, Dispersión de luz dinámica (DLS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para determinar el tamaño medio de las nanopartículas funcionalizadas en disolución y en seco respectivamente. Los resultados extraídos de la caracterización de estas nanopartículas con las técnicas que acabamos de citar, así como la discusión de los mismos, serán detallados en el siguiente apartado.

3. 5. Obtención de las nanopartículas desprotegidas finales 9.



Tras pasar el compuesto **8** a un tubo de microondas de 5 mL y sonicar para su adecuada disolución en 0.5 mL de CH_2Cl_2 , se añadió 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA). A continuación se calentó la muestra a 70°C durante 2 minutos y medio en el microondas. El producto de la reacción se pasó a un matraz y a continuación se evaporó el CH_2Cl_2 en el rotavapor para proceder a la caracterización. Se realizó de nuevo la prueba del efecto Tyndall, un espectro de infrarrojo, DLS y TEM. Al igual que en el caso de la nanopartícula anterior, los resultados extraídos de la caracterización de estas nanopartículas con las técnicas que acabamos de enumerar, así como la discusión de los mismos, serán detallados en el siguiente apartado.

4. Resultados y discusión

Como venimos comentando a lo largo de la memoria, el objetivo principal de este TFG es la funcionalización de nanopartículas magnéticas con el ligando del receptor PSMA del cáncer de próstata para su uso en el diagnóstico y/o tratamiento de dicho cáncer. En este apartado se estudiará por diferentes técnicas si la metodología utilizada para la obtención de dichas nanopartículas funcionalizadas ha sido adecuada, permitiéndonos, por tanto, alcanzar el objetivo propuesto al inicio del trabajo.

4. 1. Resultados obtenidos en el proceso de funcionalización de las nanopartículas magnéticas mediante formación de un enlace tiourea entre el isotiocianato 7 y la nanopartícula.

En primer lugar nos centraremos en la primera nanopartícula obtenida, que es el compuesto protegido **8**. En este sentido, es imprescindible indicar como primer resultado que tras aplicar la metodología detallada en el apartado anterior para la obtención del compuesto **8**, pudimos observar que al añadir CH_2Cl_2 al sólido que se obtenía después de evaporar el disolvente en el rotavapor, dicho sólido aparentemente se disolvía con gran facilidad, lo que es indicativo de que las nanopartículas, que en sí mismas son insolubles en disolventes orgánicos, probablemente se encuentren ahora recubiertas con una capa de materia orgánica, se trata, por tanto, de un dato favorable para nuestra investigación ya que indica una posible funcionalización mediante la formación de un enlace tiourea entre el isotiocianato del compuesto **7** y los grupos amino libre de la nanopartícula magnética, cuyas características están detalladas en el apartado de objetivos de esta memoria. Sin embargo, lo que ocurre con las nanopartículas funcionalizadas, se podría explicar mejor mediante el llamado efecto Tyndall estudiado en 1869 por el científico John Tyndall. (Liaw JW y cols, 2012). Si las disoluciones verdaderas y los gases sin partículas en suspensión son transparentes ya que prácticamente no dispersan la luz, las disoluciones coloidales sin embargo sí que la dispersan y por eso las partículas se pueden ver si se incide con una luz sobre el sistema, en la figura 8 se puede observar que la luz que se hace incidir sobre el vial que contiene las nanopartículas, se transmite en línea recta a lo largo del vial por la presencia de las nanopartículas en suspensión, mientras que si se hace incidir la misma luz sobre una disolución normal, este efecto no aparece.

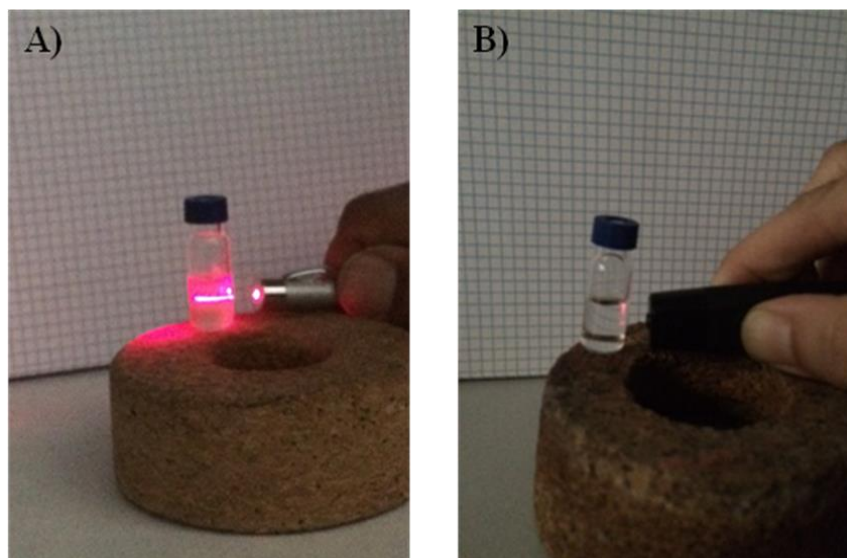


Figura 8: A) Imagen del efecto Tyndall para el compuesto **8** y para una disolución no coloidal B)

Por otro lado, al tratarse de nanopartículas paramagnéticas, la Resonancia Magnética Nuclear no da señales válidas, por lo que no es la prueba más indicada para la caracterización de este compuesto. Sin embargo, una manera sencilla y eficaz de tener evidencias sobre la formación del mencionado enlace tiourea entre el compuesto **7** y los grupos amino de la nanopartícula magnética para obtener la nanopartícula funcionalizada **8**, es comparar el espectro infrarrojo de **7** y **8**. En la figura 9, se pueden observar ambos espectros y como la banda característica del grupo isotiocianato a una longitud de onda de 2109.10 cm^{-1} aparece en el espectro de **7** y por el contrario desaparece en el espectro de **8**, las bandas de éster y de urea correspondientes al dipéptido aparecen en ambos espectros.

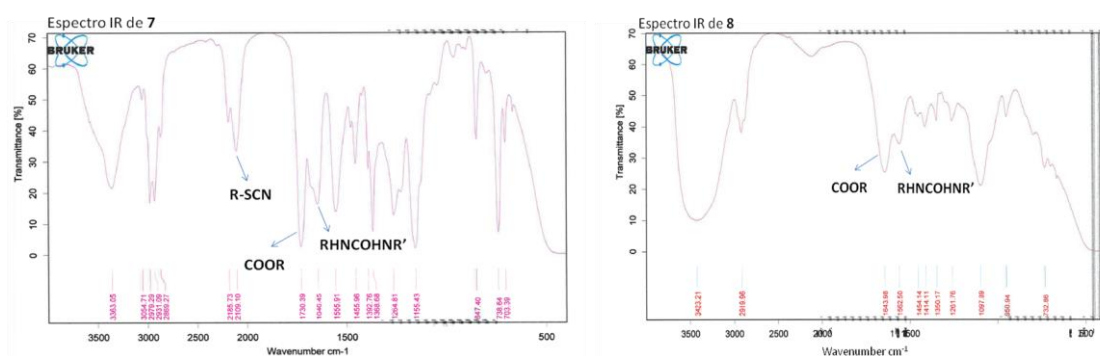


Figura 9: Espectros de IR de los compuestos **7** y **8**

Una vez que creemos tener un sistema formado por nanopartículas funcionalizadas con un compuesto orgánico en el seno de un disolvente, el CH_2Cl_2 , decidimos determinar el tamaño de partícula en disolución utilizando la técnica conocida como dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering o DLS). La Dispersión de Luz Dinámica (también conocida como

espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de la luz cuasi-elástica) es una técnica física que se puede utilizar para determinar el perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas en suspensión o de polímeros en disolución. También se puede utilizar para investigar el comportamiento de los fluidos complejos tales como las disoluciones de polímeros concentradas. Cuando la luz llega a las partículas pequeñas, la luz se dispersa en todas las direcciones (dispersión de Rayleigh), siempre y cuando las partículas sean pequeñas comparadas con la longitud de onda (por debajo de 250 nm). Si la fuente de luz es un láser, y por lo tanto es monocromática, la intensidad de dispersión fluctúa con el tiempo. Esta fluctuación es debida al hecho de que las pequeñas moléculas en disolución están experimentando movimiento browniano, por lo que la distancia entre los haces dispersados en disolución está cambiando constantemente con el tiempo. Esta luz dispersada a continuación, se somete a la interferencia ya sea constructiva o destructiva de las partículas circundantes, y dentro de esta fluctuación de intensidad, la información viene definida por la escala de tiempo de movimiento de los haces dispersados. La preparación de la muestra ya sea por filtración o centrifugación es crítica para eliminar el polvo y los artefactos de la disolución. En tiempos cortos, la correlación es alta debido a que las partículas no tienen la oportunidad de moverse en gran medida desde el estado inicial en el que estaban. Las dos señales son así esencialmente las mismas en comparación después de sólo un intervalo de tiempo muy corto. Cuando los tiempos se hacen más largos, la correlación decae exponencialmente, lo que significa que, después de que haya transcurrido un período de tiempo largo, no existe una correlación entre la intensidad dispersada de los estados inicial y final. Este decaimiento exponencial está relacionado con el movimiento de las partículas y a su vez específicamente con el *coeficiente de difusión*. El DLS se utiliza para caracterizar el tamaño de diversas partículas incluyendo proteínas, polímeros, micelas, hidratos de carbono y nanopartículas. Si el sistema es monodisperso, se puede determinar el diámetro medio de las partículas en disolución. Esta medición depende del tamaño del núcleo de la partícula, del tamaño de las estructuras de la superficie de las partículas, de la concentración de las partículas, y del tipo de iones en el medio.

Como con DLS esencialmente se miden las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por las partículas que se difunden, se puede determinar el coeficiente de difusión de las partículas. El Software de los instrumentos comerciales de DLS, normalmente muestra la población de partículas con diferentes diámetros. Si el sistema es monodisperso, sólo debe haber una población, mientras que un sistema polidisperso mostraría múltiples poblaciones de partículas. También se pueden realizar estudios de estabilidad usando DLS convenientemente. Realizando medidas periódicas de DLS de una muestra se puede observar si las partículas se agregan con el tiempo viendo si el radio hidrodinámico de las partículas aumenta. Si las partículas se han agregado, habrá una mayor población de partículas con un radio mayor.

Adicionalmente, en ciertos aparatos de DLS, se puede analizar la estabilidad dependiendo de la temperatura mediante el control de la temperatura *in situ*.

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos aplicando la técnica del DLS a las nanopartículas funcionalizadas **8**, como se puede observar en la gráfica, el tamaño medio de las nanopartículas en disolución es de unos 127 nm, se ha producido por lo tanto un aumento considerable del tamaño, desde los 20 nm de las nanopartículas antes de funcionalizar a los 127 nm del dato actual, debido a la funcionalización. Además, se observa que el sistema es mono disperso, lo cual descarta la presencia de artefactos procedentes de contaminación o de la presencia de compuesto orgánico sin estar unido a la nanopartícula.

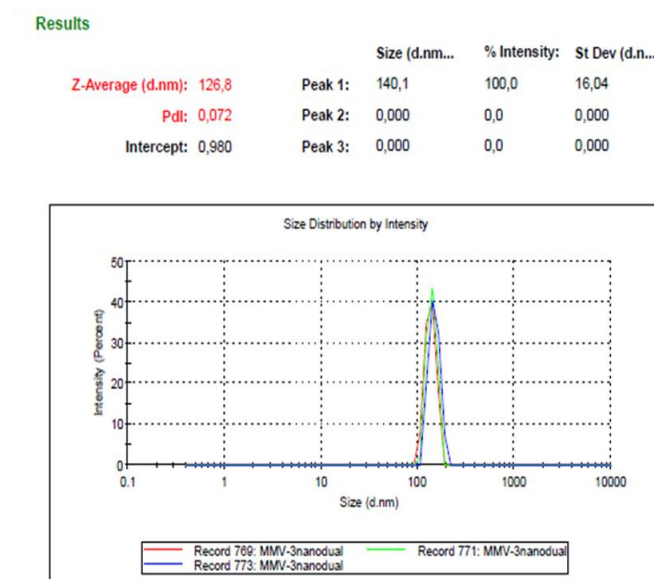


Figura 10: DLS de las nanopartículas funcionalizadas **8**

Para tener información no solo del tamaño de las nanopartículas en disolución, sino también de la forma de las mismas y su tamaño en seco, se ha utilizado una técnica microscópica, la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Estos experimentos se realizaron en el CITIUS (Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla) con el microscopio Philips CM 200 (Figura 11).

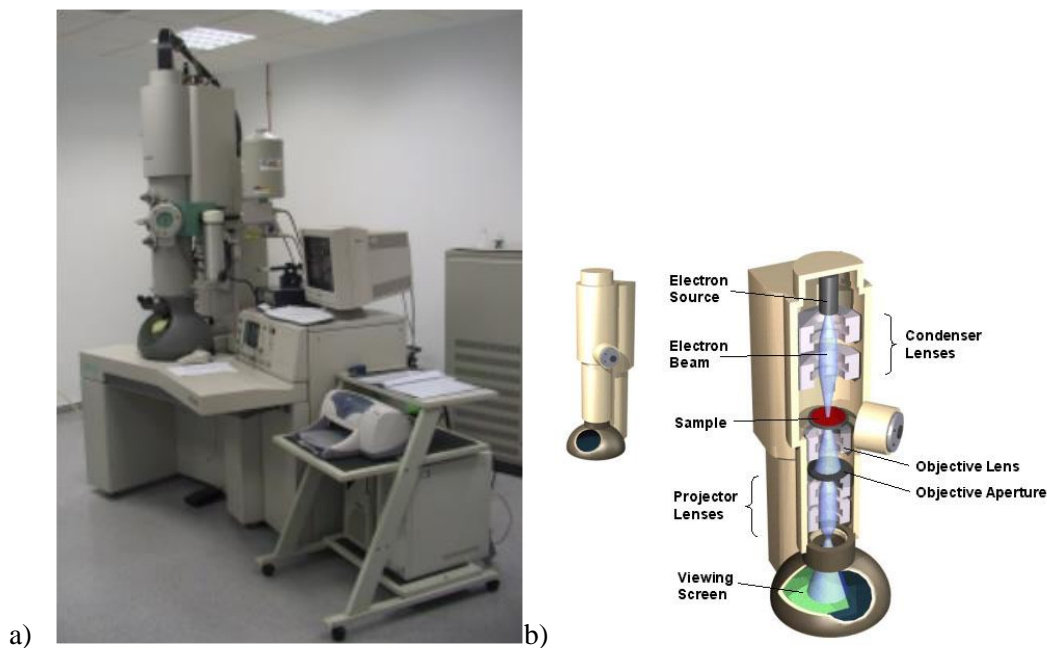


Figura 11: a) Microscopio Electrónico de Transmisión PHILIPS CM-200 (CITIUS). b) Esquema de un Microscopio Electrónico de Transmisión.

Como se puede observar en las fotografías del TEM de las nanopartículas funcionalizadas **8** de la figura 12, las nanopartículas en seco tienen forma esférica y presentan un diámetro de alrededor de 13 nm. En este caso, al igual que en el dato del DLS, podemos observar un aumento del tamaño desde los 6 nm de las nanopartículas sin funcionalizar hasta los 13 nm del dato actual, esto se debe de nuevo a la funcionalización orgánica. La diferencia entre el dato obtenido por DLS y este dato obtenido por TEM se debe a que en el primer caso estamos hablando de las nanopartículas en el seno de un líquido mientras que en este caso se trata de las nanopartículas en un ambiente totalmente seco.

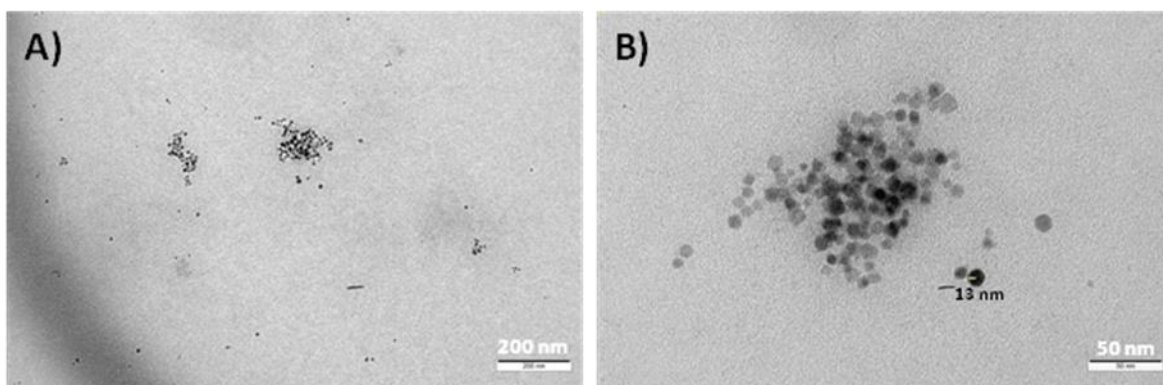


Figura 12: Imágenes del TEM del compuesto **8**. A) A 200 nm y B) a 50 nm

4. 2. Resultados obtenidos en el proceso de desprotección de las nanopartículas magnéticas **8** para obtener las nanopartículas finales **9**.

Tras la reacción de desprotección de los grupos carboxilato del dipéptido de la nanopartícula protegida **8**, detallada en el apartado anterior, y una vez evaporado el disolvente en el rotavapor, se obtuvo un sólido que pudo redisolverse en CH_2Cl_2 como en el caso de la nanopartícula anterior. En este sentido, se pudo comprobar de nuevo la presencia de las nanopartículas en la disolución gracias al efecto Tyndall. En la figura 13 se observa cómo el haz de luz describe una línea recta en el sistema debido a la presencia de las nanopartículas 13A) mientras que esta trayectoria no se observa en el caso de una disolución no coloidal 13B).

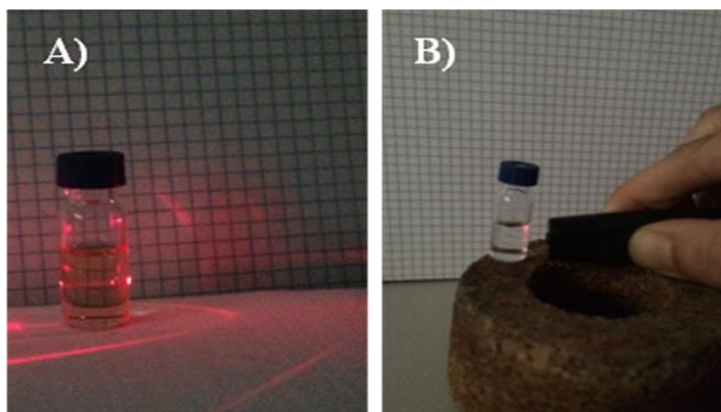


Figura 13: A) Imagen del efecto Tyndall para el compuesto **9** y para una disolución no coloidal B)

A continuación, se realizó un espectro de IR al compuesto **9** y como se puede observar en la figura 14, a pesar de que el compuesto está muy diluido y no se pueden hacer afirmaciones con gran certeza, el dato más representativo que se puede extraer en este caso, es la presencia de una banda a 3421 cm^{-1} que se puede identificar con la vibración de tensión COO-H de ácidos carboxílicos y una banda a 1675 cm^{-1} que podría corresponderse con la tensión C=O .

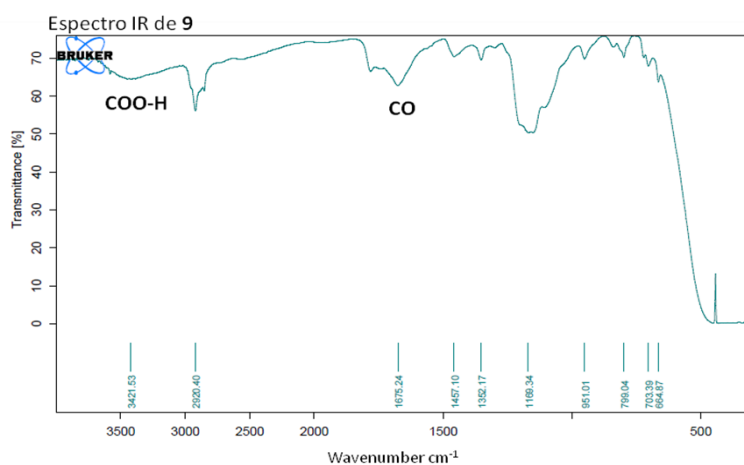


Figura 14: Espectro de IR del compuesto **9**.

Con respecto al DLS, en la figura 15 se observa que el tamaño de las nanopartículas en disolución es de aproximadamente 179 nm y que la disolución vuelve a ser monodispersa, indicando así la inexistencia de impurezas en el medio.

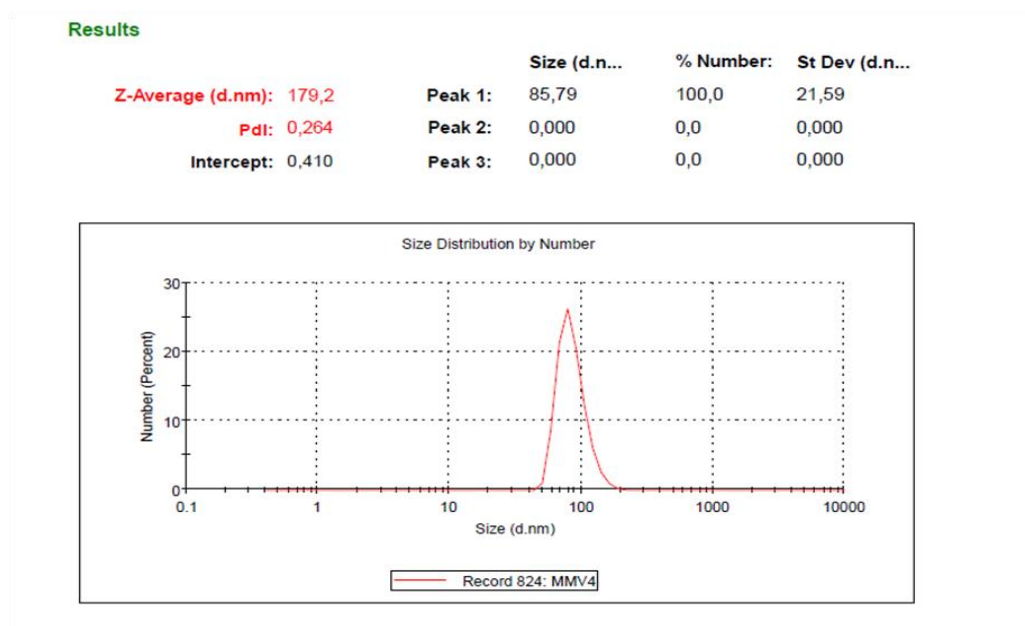


Figura 15: DLS del compuesto 9

Por último, las fotos del TEM del compuesto **9** muestran unas nanopartículas con aspecto y tamaño muy similar al de de las nanopartículas **8** como puede observarse en la figura 16.

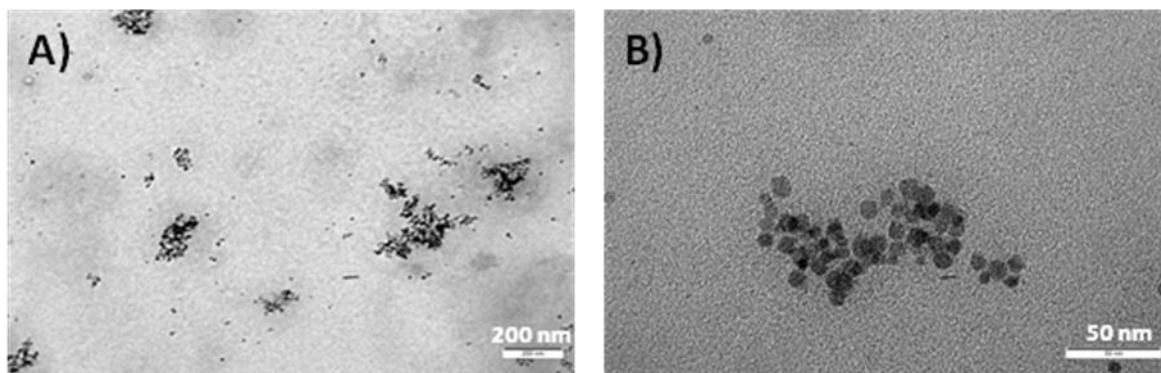


Figura 16: Imágenes del TEM del compuesto **9**. A) A 200 nm y B) a 50 nm

5. Conclusiones

- Se ha seguido una metodología adecuada para la síntesis y caracterización de los derivados del dipéptido urea Asp-CO-Glu **1**.
- Se han funcionalizado nanopartículas magnéticas con el derivado isotiocianato **7**.
- Las nanopartículas magnéticas funcionalizadas **8** se han caracterizado mediante la observación del efecto Tyndall, espectroscopía IR, DLS y TEM
- Se ha utilizado una metodología adecuada para la desprotección de las nanopartículas magnéticas **8** para obtener las nanopartículas finales **9**.
- Las nanopartículas magnéticas finales **9**, también se han caracterizado mediante observación del efecto Tyndall, espectrofotometría IR, DLS y TEM
- Finalmente, sería de gran interés realizar estudios *in vivo* e *in vitro*, que pudieran determinar la toxicidad de las nanopartículas funcionalizadas así como su utilidad en el diagnóstico y posible mejora para el tratamiento del cáncer de próstata que traería consigo la presentación multivalente del ligando del receptor PSMA por las nanopartículas.

6. Bibliografía

1. Amstad E, Gillich T, Bilecka I, Textor M, Reimhult E. Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. *Nano Lett.* 2009; 9: 4042–4048.
2. Asociación Española Contra el Cáncer. 2016 [en línea]. Consultado en Junio 2016. Disponible en: www.aecc.es
3. Banerjee SR, Foss CA, Castanares M, Mease RC, Byun Y, Fox JJ. et al. Synthesis and evaluation of technetium-99m-and rhenium-labeled inhibitors of the prostate-specific membrane antigen (PSMA). *J. Med. Chem.* 2008; 51: 4504-4517.
4. Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis ASG. Cell Response to Dextran-Derivatised Iron Oxide Nanoparticles Post Internalisation. *Biomaterials* 2004; 25: 5405–5413.
5. Bhirde AA, Chikkaveeraiah BV, Srivatsan A, Niu G, Jin AJ, Kapoor A. et col. Targeted therapeutic nanotubes influence the viscoelasticity of cancer cells to overcome drug resistance. *ACS nano.* 2014; 8(5): 4177-4189.
6. Blau WJ, Fleming AJ. Designer nanotubes by molecular self-assembly. *Science.* 2004; 304: 1457-1458.
7. Cáncer.Net. 2015 [en línea]. Consultado en Junio 2016. Disponible en: www.cancer.net
8. Chen Y, Pullambhatla M, Banerjee SR, Byun Y, Stathis M, Rojas C. et al. Synthesis and biological evaluation of low molecular weight fluorescent imaging agents for the prostate-specific membrane antigen. *Bioconjugate Chem.* 2012; 23: 2377-2385.
9. Chen Z, Penet MF, Nimmagadda S, Li C, Banerjee SR, Winnard Jr PT, Artemov D. et al. PSMA-targeted theranostic nanoplex for prostate cancer therapy. *ACS nano.* 2012; 6: 7752-7762.
10. Colombo M, Carregal-Romero S, Casula MF, Gutiérrez L, Morales MP, Böhm IB. et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *J, Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 4306–4334.
11. Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed.* 2004; 17: 544– 553.
12. Davis MI, Bennett MJ, Thomas LM, Bjorkman PJ. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *PNAS.* 2005; 102: 5981-5986.
13. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 2009; 17: 2950-2962.
14. Felgueiras J, Silva JV, Fardilha M. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *J. Zhejiang Univ-Sci. B.* 2014; 15: 16-42.

15. Fortin JP, Wilhelm C, Servais J, Menager C, Bacri JC, Gazeau F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129: 2628–2635.
16. Foss CA, , Mease RC, , Cho SY, Kim HJ, Pomper MG. GCPII imaging and cancer. *Curr. Med. Chem.* 2014; 19: 1346-1354.
17. Fu W, Madan E, Yee M, Zhang H. Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012; 1825: 140-152.
18. Gao J, Liang G, Zhang B, Kuang Y, Zhang X, Xu B. FePt@ CoS₂ Yolk-Shell Nanocrystals as a Potent Agent to Kill HeLa Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129: 1428–1433.
19. Gaster RS, Xu L, Han S-J, Wilson RJ, Hall DA, Osterfeld SJ. et al. Quantification of Protein Interactions and Solution Transport Using High-Density GMR Sensor Arrays. *Nat. Nanotechnol.* 2011; 6: 314–320.
20. Guerrero-Martinez A, Perez-Juste J, Liz-Marzan L. M. Recent Progress on Silica Coating of Nanoparticles and Related Nanomaterials. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* 2010; 22: 1182–1195.
21. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005; 26: 3995– 4021.
22. Hagspiel K. D, Neidl K. F, Eichenberger AC, Weder W, Marincek B. Detection of Liver Metastases: Comparison of Superparamagnetic Iron Oxide-Enhanced and Unenhanced MR Imaging at 1.5 T with Dynamic CT, Intraoperative US, and Percutaneous US. *Radiology (Oak Brook, IL, U.S.)* 1995; 196: 471–478.
23. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2008; 26: 57-64.
24. Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S. Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* 2010; 22: 2729–2742.
25. Hrkach J, Von Hoff D, Ali MM, Andrianova E, Auer J, Campbell T. et al. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Science translational medicine.* 2012; 4: 128ra39-128ra39.
26. Huang B, Otis J, Joice M, Kotlyar A, Thomas, TP. PSMA-Targeted Stably Linked “Dendrimer-Glutamate Urea-Methotrexate” as a Prostate Cancer Therapeutic. *Biomacromolecules.* 2014; 15: 915-923.
27. Jain T. K, Morales M. A, Sahoo S. K, Leslie-Pelecky D. L, Labhasetwar V. Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents. *Mol. Pharmaceutics* 2005; 2: 194–205.

28. Jun Y.-W, Seo J.-W, Cheon J. Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences. *Acc. Chem. Res.* 2008; 41: 179–189.
29. Kainz QM, Reiser O. Polymer- and Dendrimer-Coated Magnetic Nanoparticles as Versatile Supports for Catalysts, Scavengers, and Reagents. *Acc. Chem. Res.* 2014; 47: 667–677.
30. Kaittanis C, Santra S, Santiesteban OJ, Henderson TJ, Perez JM, The Assembly State between Magnetic Nanosensors and Their Targets Orchestrates Their Magnetic Relaxation Response. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133: 3668–3676.
31. Karakoti AS, Das S, Thevuthasan S, Seal S. PEGylated Inorganic Nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2011; 50: 1980–1994.
32. Kasten BB, Liu T, Nedrow-Byers JR, Benny PD, Berkman CE. Targeting prostate cancer cells with PSMA inhibitor-guided gold nanoparticles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013; 23: 565-568.
33. Kim BH, Lee N, Kim H, An K, Park YI, Choi Y. et al. Large-Scale Synthesis of Uniform and Extremely Small-Sized Iron Oxide Nanoparticles for High- Resolution T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12624–12631.
34. Kroon J, Metselaar JM, Storm G, van der Pluijm G. Liposomal nanomedicines in the treatment of prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 2014; 40: 578-584.
35. Lattuada M, Hatton TA. Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles. *Langmuir* 2007; 23: 2158–2168.
36. Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* (Washington, DC, U.S.) 2008, 108, 2064–2110.
37. Lee IS, Lee N, Park J, Kim B. H, Yi Y-W, Kim T. et al. Ni/NiO Core/Shell Nanoparticles for Selective Binding and Magnetic Separation of Histidine-Tagged Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 10658–10659.
38. Lee JH, Huh YM, Jun YW, Seo JW, Jang JT, Song HT. et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat. Med.* 2007; 13: 95–99.
39. Lee N, Hyeon T. Designed Synthesis of Uniformly Sized Iron Oxide Nanoparticles for Efficient Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 2575–2589.
40. Lee N, Yoo D, Ling D, Cho MH, Hyeon T, Cheon J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chemical Reviews* 2015; 115: 10637–10689.

41. Liaw JW, Tsai SW, Lin HH, Yen TC, Chen BR. Wavelength-dependent Faraday–Tyndall effect on laser-induced microbubble in gold colloid. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 2012; 113: 2234–2242.
42. Ling D, Hyeon T. Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Small* 2012; 9: 1450– 1466.
43. Machulkin AE, Ivanenkov YA, Aladinskaya AV, Veselov MS, Aladinskiy VA, Beloglazkina EK, Majouga A G. Small-molecule PSMA ligands. Current state, SAR and perspectives. *Journal of drug targeting*. 2016; 1-15.
44. Mahmoudi M, Sahraian MA, Shokrgozar MA, Laurent S. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Promises for Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis. *ACS Chem. Neurosci.* 2011; 2: 118– 140.
45. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in pharmacological sciences*. 2009, 30, 592-599.
46. McFadyen IR, Fullerton EE, Carey MJ. State-of-the-Art Magnetic Hard Disk Drives. *MRS Bulletin* 2006; 31: 379–383.
47. Moser A, Takano K, Margulies D, Albrecht M, Sonobe Y, Ikeda Y. et al. Magnetic Recording: Advancing into the Future. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2002; 35: R157–R167.
48. Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Other biomarkers for detecting prostate cancer. *BJU international*. 2009; 105: 166-169.
49. Osborne JR, Akhtar NH, Vallabhajosula S, Anand A, Deh K, Tagawa ST. Prostate-specific membrane antigen-based imaging. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2013; 31: 144-154.
50. Park J, Kang E, Son SU, Park HM, Lee MK, Kim J. et al. Monodisperse Nanoparticles of Ni and NiO: Synthesis, Characterization, Self-Assembled Superlattices, and Catalytic Applications in the Suzuki Coupling Reaction. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* 2005; 17: 429– 434.
51. Peng S, Wang C, Xie J, Sun S. Synthesis and Stabilization of Monodisperse Fe Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 10676– 10677.
52. Pernía-Leal M, Rivera-Fernández S, Franco JM, Pozo D, de la Fuente JM, García-Martín ML. Long-circulating PEGylated manganese ferrite nanoparticles for MRI-based molecular imaging. *Nanoscale* 2015; 7: 2050–2059
53. Rajasekaran AK, Anilkumar G, Christiansen JJ. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2005; 288: C975-C981.
54. Reimer P, Tombach B. Hepatic MRI with SPIO: Detection and Characterization of Focal Liver Lesions. *Eur. Radiol.* 1998; 8: 1198– 1204.
55. Sahoo B, Devi K. SP, Dutta S, Maiti TK., Pramanik P, Dhara D. Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for

- targeted drug delivery and MR imaging applications. *J. Colloid Interface Sci.* 2014; 431: 31–41.
56. Sajid MI, Jamshaid U, Jamshaid T, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *International journal of pharmaceutics.* 2016; 501(1): 278–299.
 57. Sanna V, Sechi M. Nanoparticle therapeutics for prostate cancer treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2012; 8: S31–S36.
 58. Shokouhimehr M, Piao Y, Kim J, Jang Y, Hyeon T. A Magnetically Recyclable Nanocomposite Catalyst for Olefin Epoxidation. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2007; 46: 7039–7043.
 59. Singh R, Lillard, JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology.* 2009; 86: 215–223.
 60. Slovin SF, Targeting novel antigens for prostate cancer treatment: focus on prostate-specific membrane antigen. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2005; 9: 561–570.
 61. Song H, Choi J, Huh YM, Kim S, Jun Y, Suh J. et al. Surface Modulation of Magnetic Nanocrystals in the Development of Highly Efficient Magnetic Resonance Probes for Intracellular Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 9992–9993.
 62. Sun S, Murray CB, Weller D, Folks L, Moser A. Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices. *Science* 2000; 287: 1989–1992.
 63. Tartaj P, Morales M. P, Gonzalez-Carreño T, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ. The Iron Oxides Strike Back: From Biomedical Applications to Energy Storage Devices and Photoelectrochemical Water Splitting. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* 2011; 23: 5243–5249.
 64. Tassa C, Shaw SY, Weissleder R. Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: a Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics and Therapy. *Acc. Chem. Res.* 2011; 44: 842–852.
 65. Thiesen B, Jordan A. Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 2008; 24: 467–474.
 66. Tong S, Hou S, Zheng Z, Zhou J, Bao G. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T2 contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano Lett.* 2010; 10: 4607–4613.
 67. Tykvart J, Schimer J, Bařinková J, Páchl P, Pořtová-Slavětínská L, Majer P. et al. Rational design of urea-based glutamate carboxypeptidase II (GCPII) inhibitors as versatile tools for specific drug targeting and delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 2014; 22: 4099–4108.
 68. Vieira DB, Gamarra LF. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. *Einstein (São Paulo).* 2016; 14(1): 99–103.

69. von Maltzahn G, Park JH, Lin KY, Singh N, Schwoppe C, Mesters R. et al. Nanoparticles That Communicate in Vivo to Amplify Tumour Targeting. *Nat. Mater.* 2011, 10, 545–552.
70. Walkey C. D, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134: 2139–2147.
71. Wang X, Yin L, Rao P, Stein R, Harsch KM, Lee Z. et al. Targeted treatment of prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2007; 102: 571-579.
72. World Health Organization. 2014 [en línea]. Consultado en Junio 2016. Disponible en: www.who.int/es
73. Xiang B, Dong DW, Shi NQ, Gao W, Yang ZZ, Cui Y, Cao DY, Qi XR. PSA-responsive and PSMA-mediated multifunctional liposomes for targeted therapy of prostate cancer. *Biomaterials* 2013; 34: 6976-6991.
74. Zakaria AB, Picaud F, Rattier T, Pudlo M, Saviot L, Chassagnon R. et al. Nanovectorization of TRAIL with single wall carbon nanotubes enhances tumor cell killing. *Nano Lett.* 2015; 15(2): 891-895.